
PUHDASTILOJEN PUHDASVESI

PMEU-salkun mahdollisuudet veden puhtauden mikrobiologisessa tutkimisessa

Katri Holopainen
Sari Lötjönen
Jenni Tuovinen

Opinnäytetyö

Ammattikorkeakoulututkinto



Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Katri Holopainen, Sari Lötjönen ja Jenni Tuovinen	
Työn nimi Puhdastilojen puhdasvesi: PMEU -salkun mahdollisuudet veden puhtauden mikrobiologisessa tutkimisessa	
Päiväys	01.12.2010
Sivumäärä/Liitteet	33/5
Ohjaaja(t) Lehtori Leena Tikka	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushanke 2009-2010	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Tarkoituksena oli testata PMEU (Portable Microbe Enrichment Unit)-salkun mahdollisuuksia puhdastilojen puhtaan veden mikrobiologisessa tutkimuksessa. Tavoitteena oli selvittää, onko PMEU nopeampi menetelmä kuin tällä hetkellä käytössä oleva maljakasvatus ja voitaisiinko sitä käyttää hyödyksi Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushankkeen puhdastiloissa.</p> <p>Testaus tehtiin kahdessa vaiheessa. Hankkeen puhdastiloissa sijaitsevista puhdasvesihanoista otetut vesinäytteet kasvatettiin sekä salkussa että maljoilla. Näin vertailtiin menetelmien rikastusnopeutta. Lisäksi PMEU:n ominaisuuksia testattiin maitohappobakteeria sisältävän näytteen avulla. Tällä pyrittiin selvittämään, millä pitoisuuksilla ja kuinka nopeasti mikrobit alkavat rikastua salkussa. Mahdollinen kasvu havaitaan ruiskujen sameutena.</p> <p>Vesinäytteiden osalta asetetut tavoitteet saavutettiin. Tulokset saadaan PMEU-salkulla nopeammin, koska näyteruiskuihin voidaan laittaa näytettä kasvamaan suurempia määriä kuin maljoille. Mitä suurempi näytteen määrä on alussa, sitä nopeammin kasvu ilmenee. PMEU:ssa saadaan rikastettua sellaisetkin mikrobit, joita ei maljamenetelmällä saada esiin. PMEU on siis herkempi menetelmä kuin maljakasvatus. Maitohappobakteerikasvatuksen testauksesta ei saatu tavoiteltua hyötyä. Näytteiden pitoisuuserot olivat liiallisen laimennuksen vuoksi niin pieniä, että näytteet alkoivat kasvaa lähes samanaikaisesti. Tästä syystä kuvaajaa niiden kasvusta ei voitu piirtää. Kuvaaja olisi kertonut PMEU:n rikastusominaisuuksista.</p> <p>Luotettavuutta varmistettiin käyttämällä kontrollinäytteitä. Teoriatiedon hankinnassa ja tulosten tulkinnassa käytettiin asiantuntija-apua. Tutkimus suoritettiin vain kerran, joten vertailutulosten puute heikentää tulosten luotettavuutta. Tutkimuksessa kävi ilmi, että vettä juoksettaessa putkistoista voi irrota epäpuhtauksia veteen. Juoksettamattoman ja juoksetun puhtaan veden eroja voitaisiin vielä tutkia.</p>	
Avainsanat Vesi, mikrobiologia, rikastus, puhtaus	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Katri Holopainen, Sari Lötjönen and Jenni Tuovinen			
Title of Thesis Purified water in clean rooms: PMEUs abilities in the microbiological testing of purified water			
Date	01.12.2010	Pages/Appendices	33/5
Supervisor(s) Principal lecturer Leena Tikka			
Project/Partners Cleanroom research and training centre project 2009–2010			
<p>Abstract</p> <p>The goal was to test PMEUs (Portable Microbe Enrichment Unit) abilities in microbiological testing of purified water. The aim was to find out if the PMEU would be a faster method than culturing with agar plates, which is currently in use, and if the PMEU could be utilized in the Cleanroom research and training centre projects cleanrooms.</p> <p>The testing was done in two parts. Samples taken from purified water -taps were enriched in PMEU and in agar plates. This way their enriching abilities could be compared. PMEUs abilities were also tested with a lactic acid bacteria sample. The goal was to test in which concentration microbes start to enrich in PMEU and how fast. The samples go blurry when growth occurs.</p> <p>The goals that were set for water sample testing were achieved. The greater the amount of specimen, the faster the growth can be seen in it. With PMEU, a larger amount of specimen can be enriched at once and that's why the growth can be seen more rapidly. It also offers a better atmosphere to the environmentally stressed microbes, which cannot be detected with agar plates.</p> <p>The lactic acid bacteria was diluted too much and that's why the differences between different concentrations were too small and could not be detected. The samples also started to grow (got blurry) during the night, so a curve could not be drawn to show PMEUs enriching abilities.</p> <p>Control samples were used to increase the reliability of the study. The help of the experts was used in interpreting the results which also increases the reliability. The testing was only done once so the lack of comparison weakens the reliability of the results. Testing showed that contaminants can be detached from the water pipes to the purified water. The differences between running and not running the water before using it could be tested further.</p>			
Keywords: Water Microbiology, Microbiological Techniques, Incubators, Environment, Controlled			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	6
2	TAUSTA - AINEISTO	8
2.1	Talousvedestä puhdasvedeksi.....	8
2.2	Mikrobiologinen näytteenotto ja mikrobien kasvu.....	10
2.3	Puhdastilat.....	11
2.4	Puhdastilojen luokitus	12
2.5	Puhdastilaratkaisut, -pukeutuminen ja -siivous	14
2.6	PMEU (Portable Microbe Enrichment Unit).....	14
3	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTTAMINEN.....	17
3.1	Työn lähtökohdat, tavoitteet ja aiheen rajausta.....	17
3.2	Resurssit	17
3.3	Opinnäytetyön toteutus.....	18
3.3.1	Puhdasvesinäytteet	18
3.3.2	Maitohappobakteeria sisältävät näytteet.....	20
3.3.3	Kasvun tarkastelu.....	21
4	TULOKSET	22
4.1	Puhdastilojen vesinäytteet	22
4.2	Maitohappobakteeria sisältävät näytteet.....	24
5	POHDINTA.....	25
5.1	Puhdastilojen vesinäytteet	25
5.2	Maitohappobakteeria sisältävät näytteet.....	27
5.3	Johtopäätökset ja kehittämishaasteet	28
5.4	Luotettavuus ja eettisyys	28
	LÄHTEET.....	30
	LIITTEET	
	Liite 1 Puhdastilojen käsienpesuohje	
	Liite 2 D ₂ -näytteiden tulokset	
	Liite 3 D ₂ -0 -näytteiden tulokset	
	Liite 4 B ₂ -näytteiden tulokset	
	Liite 5 Maitohappobakteerinäytteiden tulokset	

1 JOHDANTO

Puhdastilaksi kutsutaan tilaa, jossa ilman lämpötilaa, kosteutta ja paine-eroja säätelemällä kontrolloidaan ilmassa esiintyvien partikkelien määrää. Tilat on rakennettu ja niitä on käytettävä siten, että partikkelien sisäänpääsy, syntyminen ja pysyminen tilassa on minimoitu. Puhdastilatekniikalla pyritään eliminoimaan haitallisten mikrobien ja hiukkasten aiheuttamia haittoja laboratorioissa ja tuotantotiloissa. (CleanRoomTech 2008a.) Puhdastilat jaetaan eri puhdastilaluokkiin, jotka määräytyvät niistä mitattavien partikkelien koon mukaan (Rissanen 2010a). Tilojen hiukkaspitoisuutta valvotaan, sillä mitä enemmän partikkeleita esiintyy, sitä suurempi todennäköisyys on, että niiden mukana tiloihin tulee myös mikrobeja (Malmioja 2010). Ilmassa olevien partikkeleiden lisäksi valvotaan pintojen puhtautta sekä henkilökunnan vaatetuksen puhtautta. Myös puhdastilojen siivousta ja sen tehokkuutta valvotaan mikrobiologisella näytteenotolla. (Rajala 2007, 9–11.)

Kaikesta puhdastilassa käytetystä kemikaalimäärästä 99,5 % on vettä. Prosessikemikaalit ovat enimmäkseen vesiliuoksia, joita laimennetaan lisää vedellä. Kaikki puhdistus- ja syövytysprosessit vaativat vettä suuria määriä huuhteluun. Käytettävältä vedeltä vaaditaan erittäin suurta puhtautta, joten se valmistetaan useiden suodatusvaiheiden ja käänteisosmoosin avulla. (Heikkilä 2009.)

PMEU-salkku on kehitetty näytteiden kuljetusta ja viljelyä varten (Samlion Oy 2010). Siinä näytteet, jotka voivat olla joko nestemäisiä, pyyhkäisynäytteitä tai jotakin kiinteää materiaalia, kasvatetaan erityisissä näytteenottoruiskuissa (Heitto 2010). Salkkuun saadaan luotua ihanteelliset rikastusolosuhteet syöttämällä näytteisiin ilmaa tai kaasua ravinteiden sekoittuvuuden parantamiseksi, käyttämällä tarkoituksenmukaisia ravintoalustoja sekä valvomalla näytteiden kasvatustilaa. Liikuteltavuutensa ansiosta näytteiden rikastus alkaa välittömästi näytteenoton jälkeen. (Samlion Oy 2010.)

Opinnäytetyömme idea tutkia PMEU (Portable Microbe Enrichment Unit)-salkun käyttömahdollisuuksia puhtaan veden mikrobiologisessa tutkimisessa lähti Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushankkeen 2009–2010 tarpeesta saada käyttöön maljaviljelyä nopeampi menetelmä veden puhtauden tutkimiseen. Hanke on jatkoa vuosina 2006–2007 Savon koulutuskuntayhtymän hallinnoimalle Puhdastilahankkokonaisuudelle, jonka aikana rakennettiin GMP:n (Good Manufacturing Practice eli Hyvät tuotantotavat) mukaiset puhdastilat Kuopion Biotekniaan, Neulaniementie 2:een. Tilat sisältävät luokkatilan, harjoitustilan ja varsinaiset puhdastilat. Puhdastilahankkeen tavoitteena on työ-

markkinoita edistävien osaamis- ja tutkimuspalvelujen kehittäminen sekä kehittyminen GMP-normien mukaisesti puhdistilakoulutusta järjestäväksi kehittämiskeskukseksi. Osatoimijoina hankkeessa ovat Itä-Suomen yliopisto Kuopion kampus / A.I.Virtanen Instituutti, Savonia-ammattikorkeakoulu, Pohjois-Savon sairaanhoitopiiri, sairaala-apteekki ja YIT Oyj. Hankkeen keskeisiä kohderyhmiä ovat lääketeollisuus ja apteekit, bioteknologia- ja laboratorioala, tekniset palvelualat, pesula-, puhdistus- ja palveluala, elintarvike- ja elektroniikkateollisuus, sairaaloiden operatiiviset yksiköt sekä edellä mainittujen alojen opiskelijat. (Savon ammatti- ja aikuisopisto 2010a.)

Puhdistila tutkimus- ja koulutuskeskushanke käyttää puhdistiloissaan puhtaan veden tuottamiseen Millipore RO (reverse osmosis)–puhdistuslaitteistoa, jolla pystytään poistamaan 95–99 % kaikista epäpuhtauksista (Rissanen 2010b; Millipore 2010c). Hanke käyttää käänteisosmoosilla puhdistettua vettä puhdistilojen siivouksessa C-puhdistilaluokkaan asti sekä puhdistiloissa käytettävien 70 % alkoholilaimennosten tekemiseen. Veden puhtautta tutkitaan ottamalla vesinäytteitä käänteisosmoosilla puhdistetusta vedestä ja kasvattamalla näytteitä maljoilla viisi vuorokautta. Kaksi ensimmäistä vuorokautta maljoja kasvatetaan lämpökaapissa ja kolme seuraavaa huoneenlämmössä. Puhdistila koulutus- ja tutkimuskeskushanke halusi testata, saataisiinko tulokset veden puhtaudesta nopeammin käyttämällä bakteerien kasvatukseen kannettavaa mikrobien rikastusyksikköä, PMEU-salkkua.

Työmme on kehittämistyö. Tarkoituksena oli tutkia PMEU-salkun käyttömahdollisuuksia puhtaan veden mikrobiologisessa tutkimuksessa. Puhdistilahanke on hankkinut PMEU-salkun jo aiemmin, mutta sen hyötyä puhtaan veden puhtauden tutkimisessa ei ole testattu. Tavoitteena oli siis selvittää, voisiko Puhdistilahanke hyödyntää salkkua saadakseen tiedon vedessä mahdollisesti kasvavista bakteereista nopeammin. Nykyisin käytössä oleva maljakasvatus on suhteellisen hidas menetelmä.

Opinnäytetyöllä osoitamme, että osaamme käyttää bioanalytiikan koulutusohjelmassa oppiamme tietoja ja taitoja itsenäisesti. Lisäksi osoitamme, että kannamme vastuuta työstämme suunnittelemalla, toteuttamalla, viimeistelemällä ja julkaisemalla kehittämistyömme opinnäytetyöprosessin mukaisesti. Työssämme korostuu erityisesti mikrobiologinen osaamisemme, sillä toteutuksessa käytimme erilaisia mikrobiologisia viljely- ja kasvatusmenetelmiä. Lisäksi teimme kaikki työssä tarvittavat laimennokset itse.

2 TAUSTA - AINEISTO

Bakteerit tarvitsevat selviytyäkseen ja lisääntyäkseen tietyntyyppiset olosuhteet, ravintoa ja oikeanlaisen lämpötilan. Ehdottomat anaerobit bakteerit, jotka eivät käytä kasvaessaan happea, tarvitsevat niille sopivan hapettoman kaasuseoksen, kun taas ehdottomat aerobit bakteerit, jotka käyttävät happea aineenvaihdunnassaan, tarvitsevat happea orgaanisten aineiden hapettamiseksi. Fakultatiiviset anaerobit ovat bakteereja, jotka voivat lisääntyä sekä hapen läsnä ollessa että hapettomissa olosuhteissa. Osa bakteereista lisääntyy parhaiten hiilidioksidiatmosfäärissä. Ihmisen normaaliflooran bakteerit ja kliinisiä tauteja aiheuttavat mikrobit elävät parhaiten +35–37 C°:ssa. Osa bakteereista elää jopa kuumissa lähteissä ja mannerjäätiköillä. Ravinnon suhteen osa bakteereista on vaativia, kun taas osa tarvitsee vain yksinkertaisia ravinteita. Tärkeitä ravinteita ovat mm. monet orgaaniset aineet, kuten erilaiset sokerit. (Heikkilä 2002, 34–35.)

2.1 Talousvedestä puhdasvedeksi

Sosiaali- ja terveysministeriö (461/2000) antaa yleiset määräykset talousveden laatuvaatimuksista sekä tarvittavista tutkimuksista asetuksessaan talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Asetuksen mukaan talousvedessä ei saa olla pieneliöitä, loisia tai mitään aineita sellaisina määrinä tai pitoisuuksina, joista voi olla vaaraa ihmisen terveydelle. Taulukossa 1 on esitetty talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset ja taulukossa 2 talousveden laatusuositukset. Lyhenne pmy tarkoittaa pesäkettä muodostavaa yksikköä.

TAULUKKO 1. Talousveden mikrobiologiset laatuvaatimukset (*Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 461/2000*)

Bakteeri	Enimmäistiheys
Escherichia coli	0 pmy/100 ml
Enterokokit	0 pmy/100 ml

TAULUKKO 2. Talousveden laatusuositukset (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 461/2000)

Bakteeri	Tavoitteelliset enimmäisarvot
Clostridium perfringens (mukaanlukien itiöt)	0 pmy/100 ml (mitataan, jos raakavesi on pintavettä)
Koliformiset bakteerit	0 pmy/100 ml
Pesäkkeiden lukumäärä (22 °C)	ei epätavallisia muut oksia

Kuopion kaupunkialueen raakaveden hankinta perustuu rantaimetykseen, jossa järvi-
vesi suodattuu vettä johtavien maakerrosten läpi, jolloin orgaaninen aines ja vedessä
olevat mikrobit poistuvat tehokkaasti. Kaupungin päävesilaitokselta jakeluun lähtevä vesi
desinfoidaan kloorilla ennen kulutukseen johtamista, ja Melalahden, Vehmersalmen ja
Kurkimäen ottamoiden vesi desinfoidaan ultravioletivalolla. Vedenpuhdistuksessa ei
käytetä mitään kemikaaleja. Talousveden laatua tutkitaan viranomaisvalvonnan lisäksi
Itkonniemen vesilaitoksen laboratoriossa päivittäin. (Kuopion vesi 2009.)

Puhdistuksista huolimatta hanavesi sisältää eläviä mikro-organismeja. Bakteerit voivat
aiheuttaa erilaisia ongelmia laboratorikokeissa joko suoraan tai sivutuotteidensa, kuten
alkalisen fosfaatin kautta. (Millipore 2010a.) Veden laatu on tärkeää, sillä vesi on tär-
kein kemiallinen aine puhdistiloissa. Kaikesta puhdistilassa käytetystä kemikaalimää-
rystä 99,5 % on vettä. Prosessikemikaalit ovat enimmäkseen vesiliuoksia, joita laimen-
netaan lisää vedellä. Kaikki puhdistus ja syövytysprosessit vaativat vettä suuria määriä
huuhteluun. Käytettävältä vedeltä vaaditaan erittäin suurta puhtautta, joten se valmiste-
taan useiden suodatusvaiheiden ja käänteisosmoosin avulla. (Heikkilä 2009.)

Laboratoriovesi jaetaan kolmeen eri luokkaan sekä teknisten että taloudellisten syiden
mukaan. Veden jakaminen luokkiin takaa, että oikeanlaista vesilaatua käytetään oikean-
laisiin tarkoituksiin ja että kustannukset pysyvät tarkoituksenmukaisina, sillä tyyppin 1 vesi
on kalliimpaa tuottaa kuin tyyppin 2 ja 3 vesi. Laboratoriokäyttöön tarkoitettujen laborato-
rioviesien laatu määritellään standardien ASTM (American Society for Testing and Mate-
rials) ja ISO (International Organization for Standardization) 3696 mukaisesti, ja kliini-
seen laboratoriokäyttöön tarkoitettujen laboratoriovesien laatu CLSI (Clinical and Labo-
ratory Standards Institute)-ohjeistuksen mukaan. (Millipore 2010b.) Taulukossa 3 näkyy
sallitut bakteerimäärät eri laboratoriovesiluokissa.

TAULUKKO 3. Eri laboratoriovesiluokkien sallitut bakteerimäärät (Millipore 2010b)

Kontaminaatio	Suure ja yksikkö	Tyyppi 3	Tyyppi 2	Tyyppi 1
Bakteerit	Bakteerit (pmy/ml)	<1000	<100	<1

Tyyppi 3 vesi on alhaisin laboratoriovesiluokista, jota suositellaan lasitavaran huuhteluun, hauteiden lämmittämiseen ja autoklaavien täyttämiseen. Tyyppi 2 vettä käytetään tavanomaiseen laboratoriokäyttöön, kuten puskuriliuosten, pH-liuosten ja mikrobiologisten elatusaineiden valmistamiseen sekä kliinisiin analysointireihin, soluviljelyinkubaattoreihin ja kemiallisiin analyyseihin tai synteeseihin käytettävien reagenssien valmistamiseen. Tyyppi 1 vettä vaaditaan kriittiseen laboratoriokäyttöön, puskuriliuosten ja elatusaineiden valmistukseen nisäkässoluviiljelmiin ja koeputkihedelmöityksiin, reagenssien tuottamiseen molekyylibiologian käyttöön ja liuosten valmistamiseen elektroforeesiin ja blottaukseen. (Millipore 2010b.)

Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushankkeen tiloissa puhtaan veden tuottamiseen käytetään Millipore RiOs 16 -puhdistuslaitteistoa jatkuvalla kierrolla varustetulla putkistolla (Rissanen 2010b). Laitteiston avulla pystytään tuottamaan talousvedestä tyyppi 3 vettä. Puhdistustekniikkana Millipore RO -laitteistossa käytetään käänteisosmoosia, joka on taloudellisin tapa poistaa 95–99 % kaikista epäpuhtauksista. Osmoosi on liuottimen kulkeutumista puoliläpäisevän kalvon läpi laimeammasta liuksesta väkevämpään eli sieltä, missä on enemmän liuotinta sinne, missä on vähemmän liuotinta. Käänteisosmoosin avulla puhdasta vettä syntyy paineessa, joka on suurempi kuin konsentraatin ja puhtaan veden välinen osmoottinen paine. Huokoisen rakenteensa ansiosta käänteisosmoosikalvot pystyvät torjumaan lähes 99-prosenttisesti käytännössä kaikki partikkelit, bakteerit ja orgaanit, jotka ovat molekyylipainoltaan yli 200 Daltonia. (Millipore 2010c.)

2.2 Mikrobiologinen näytteenotto ja mikrobien kasvu

Mikro-organismit elävinä organismeina eivät jakaudu tasaisesti tutkittavassa näytteessä, ja niiden jakaantumisessa esiintyy luontainen määrä vaihtelua. Tarkoituksenmukainen näytteenotto on ehdoton edellytys edustavien näytteiden saamiseksi. (SFS-EN 19458 2007.) Mikrobiologisen näytteenottajan tulee ymmärtää näytteiden merkitystä ja määrittämis menetelmiä, jotta pystyy arvioimaan, mitkä seikat voivat pilata kyseisen näytteen (Ylönen 2002, 98). Näytteenottoa koskevat vaatimukset riippuvat näytteenoton tavoitteesta sekä näytteen luonteesta (SFS-EN 19458 2007). Näytteet on tämän vuoksi otettava aina laboratorio-ohjeiden mukaisesti (Ylönen 2002, 98). Huolellisuus näytteiden otossa ja säilyttämisessä, puhtaat työskentelypinnat, kalibroidut työskentelyvälineet,

koulutettu näyttöönottaja ja validoidut työskentelytavat takaavat luotettavat tulokset (Milipore 2010d).

Bakteerit viljellään joko maljoilla kiinteillä agarpohjaisilla elatusaineilla tai nestemäisessä elatusaineessa. Kiinteällä elatusaineella lisääntyvä bakteeri ei pysty liikkumaan, jolloin muodostuu kullekin bakteerille ominainen pesäke. (Heikkilä & Meurman 2002, 94.) Kasvatusalustoissa ravintoaineiden saatavuus on rajallinen, joten bakteerien tyypillistä elin sykliä voidaan kuvata kasvukäyrällä. Lisättäessä bakteereja tuoreeseen kasvatusliuokseen seuraa lag-vaihe eli viivevaihe, jolloin bakteerit eivät lisäänty vaan ne sopeutuvat uusiin olosuhteisiin. Sen pituus riippuu bakteerien aikaisemmista elinolosuhteista. Lag-vaihe johtuu siitä, että bakteerien täytyy valmistaa uusia elintärkeiden aineenvaihduntatuotteiden tuotannossa tarvittavia entsyymejä elatusaineen hyödyntämiseksi tai toipua aikaisemmista solua vahingoittaneista käsittelyistä. Lag-vaihetta seuraa eksponentiaalisen kasvun vaihe, jolloin bakteerit lisääntyvät nopeasti. (Solunetti 2006.) Yksi lisääntymiskykyinen bakteeri jakaantuu 18 tunnissa miljooniksi jälkeläisiksi (Heikkilä & Meurman 2002, 100). Ympäristötekijät kuten lämpötila ja kasvatusliuos sekä bakteerien geneettiset ominaisuudet vaikuttavat bakteerisolujen kasvunopeuteen. (Solunetti 2006.) Useimmat bakteerit kasvavat 1–2 vuorokaudessa. (Heikkilä & Meurman 2002, 94.) Kun jokin välttämätön kasvuun tarvittava ravintoaine on kulutettu loppuun ja / tai aineenvaihdunnan haitalliset lopputuotteet keräytyvät kasvatusliuokseen estäen solujen kasvua, seuraa stationäärivaihe. Tyypillistä on, että solujen kasvu pysähtyy, vaikka solujen energia-aineenvaihdunta ja biosynteettiset prosessit, joissa uusia yhdisteitä syntyy yksinkertaisimmista lähtöaineista, jatkuvat. Kasvu voi myös jatkua, mutta bakteereja syntyy ja kuolee yhtä paljon, jolloin lukumäärä säilyy vakiona. Stationäärivaiheen saavuttamisen jälkeen bakteerisolut alkavat kuolla ja saavuttavat kuolinvaiheen. Tällöin kuolevia soluja on enemmän kuin syntyviä. (Solunetti 2006.)

2.3 Puhdastilat

Puhdastilaksi kutsutaan tilaa, jossa ilmassa esiintyvien partikkeleiden määrää kontrolloidaan säätelämällä ilman lämpötilaa, kosteutta ja paine-eroja ja joka on rakennettu ja jota käytetään niin, että partikkeleiden sisäänpääsy, syntyminen ja pysyminen tilassa on minimoitu. Puhdastilatekniikalla pyritään eliminoimaan haitallisten mikrobien ja hiukkasten aiheuttamia haittoja laboratorioissa ja tuotantotiloissa. Puhdastilojen tarkoituksena on suojata sekä ihmistä että tuotantoa. Puhdastiloja voidaan käyttää esimerkiksi lääke- ja bioteollisuudessa, sairaaloissa ja apteekeissa, elintarviketeollisuudessa sekä elektroteollisuudessa. (CleanRoomTech 2008a.)

Kaikissa puhdastiloissa valvotaan tiettyjä ilman fysikaalisia parametreja, jotka ovat lämpötila, kosteus, paine ja puhtaus. Niitä tutkitaan partikkelimäärien mittauksilla ja mikrobiologisilla näytteillä. Puhdastiloista tehdään näytteenottoja niin työskentelyn aikana kuin työskentelyn jälkeen. Ilmassa olevien partikkeleiden lisäksi valvotaan pintojen puhtautta sekä henkilökunnan vaatetuksen puhtautta. Näytteiden määrä ja näytteenottotiheys määritellään sen mukaan, kuinka suuri mahdollisuus tuotteella on kontaminoitua. Myös puhdastilojen siivousta ja sen tehokkuutta valvotaan mikrobiologisella näytteenotolla. Puhdastiloista löydetyt mikrobit tunnistetaan ja selvitetään, mistä kontaminaatio puhdastiloissa on johtunut. (Rajala 2007.)

2.4 Puhdastilojen luokitus

Puhdastilojen suunnittelussa halutaan saada hallittu ja valvottu ilmanpuhtaus luokiteltuun tilaan. Luokittelu tapahtuu standardin ISO 14644 mukaan tai lääkevalmisteita valmistettavassa tilassa GMP-säädösten mukaisin luokituksin. Puhdastilastandardissa ISO 14644 kerrotaan esimerkiksi puhdastilojen suunnittelusta, rakentamisesta, käyttöönotosta ja käytöstä. (Miettinen 2006.) Lääkevalmistusprosessin yleiset ohjeet kerrotaan GMP:ssä, joka antaa omat standardit aseptisille tiloille. Puhdastilojen luokitus perustuu sallittujen ilmassa olevien hiukkasten määrään. Standardin ISO 14644 mukaisissa puhdastiloissa on sallittu suuremmat partikkelikoot ja -määrät kuin GMP-luokituksen tiloissa. Euroopassa on yleisimmin käytössä ISO-luokitus. Siinä on kerrottu ilman suurimmat sallitut partikkelikoot ja määrät. Puhtausluokkia on yhdeksän kappaletta, joista ISO 1 on puhtain. GMP:ssä on luokitukset A:sta D:hen, joista A on puhtain. (CleanRoomTech 2008b).

TAULUKKO 4. Ilman suurimmat sallitut partikkelikoot ja -määrät kuutiometrissä ilmaa standardin ISO 14644 mukaan (EngineeringToolBox 2010)

ISO-luokat	Partikkelien koko ja niiden lukumäärä/m ³					
	> 0,1µm	> 0,2 µm	> 0,3 µm	> 0,5 µm	> 1 µm	> 5 µm
ISO luokka 1	10	2				
ISO luokka 2	100	24	10	4		
ISO luokka 3	1000	237	102	35	8	
ISO luokka 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
ISO luokka 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
ISO luokka 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
ISO luokka 7				352 000	83 200	2 930
ISO luokka 8				3 520 000	832 000	29 300
ISO luokka 9				35 200 000	8 320 000	293 000

Taulukossa 4 esitetään ilman suurimmat sallitut partikkelikoot ja -määrät ISO standardin mukaisissa puhdastiloissa, eli montako 0,1 µm:ä pienempää tai suurempaa hiukkasta sallitaan yhdessä kuutiometrissä ilmaa. Esimerkiksi ISO-luokan 5 puhdastilassa sallitaan yli 0,1 µm kokoisia hiukkasia 100 000 per kuutiometri. (VWR 2010.)

TAULUKKO 5. Suurin sallittu hiukkasmäärä kuutiometrissä ilmaa GMP-luokituksen mukaan (CleanRoomTech 2008b)

Luokka	Lepotilassa		Työskentelyn aikana	
	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm
A	3500	0	3500	0
B	3500	0	35 000	2000
C	350 000	2000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	ei määritelty	ei määritelty

Taulukossa 5 esitetään GMP-luokituksen mukaisten puhdastilojen suurimmat sallitut partikkelikoot ja määrät yhtä kuutiometriä ilmaa kohden. Esimerkiksi B-luokan puhdastilassa sallitaan lepotilassa 3500 hiukkasta/m³, jotka ovat kooltaan 0,5 µm. Samassa tilassa sallitaan työskentelyn aikana 5.0 µm suurempia hiukkasia 2000 /m³. (CleanRoom-Tech 2008b.)

2.5 Puhdastilaratkaisut, -pukeutuminen ja -siivous

Ilmanvaihto ja puhdastilarakenteet ovat puhdastilojen ilman puhtauden kannalta tärkeitä. Puhdastiloissa käytetään kahta perustoteutusratkaisua, turbulenttista ja laminaarista. Turbulenttinen tilaratkaisu on yleisesti käytössä lääketeollisuudessa kun taas laminaarista käytetään enemmän muissa teollisuuslaitoksissa. Myös näiden kahden tilaratkaisumallin yhdistelmiä käytetään. Turbulenttisessa tilamallissa puhdastiloihin tuleva ilma pyritään saamaan turbulentiin eli pyörivään liikkeeseen. Tällä tavoin halutaan varmistaa, että puhdastilaan ei jää kohtia, johon ilma jäisi seisomaan paikoilleen. Paikallaan olevat ilmamassat ovat riski puhdastiloissa, sillä mahdolliset partikkelit voivat kasautua tällaisiin paikkoihin. Laminaarisessa puhdastilaratkaisussa ilma pyritään saada virtaamaan mahdollisimman hyvin ylhäältä alas puhdastilojen läpi. (Rissanen 2010a.)

Työntekijät pukeutuvat puhdastiloissa työskennellessään erityisiin puhdastilavaatteisiin. Oikeanlaisen vaatetuksen on todettu vähentävän ihmisestä ilmaan irtoavien hiukkasten määrää merkittävästi. Pukeutumiselle on tilan puhtausluokituksen mukaan erilaisia vaatimuksia esimerkiksi suojavaatteen peittävydestä. Asujen materiaalin valintaan vaikuttavat partikkeleiden läpäisevyys, ilman kosteuden läpäisevyys, pesuominaisuudet, käytöikä ja käyttömukavuus. Puhdastilavaatetuksen vaihtotiheys riippuu puhtausluokasta ja käyttötarkoituksesta. Puhdastilapukeutuminen vaatii asiantuntijan antamaa opastusta sekä oikeanlaisten liikkeiden opettelua. (Rajala 2007.)

Puhdastilasiivous poikkeaa paljon tavanomaisesta laitossiivouksesta. Siivouksen laadussa tärkeitä tekijöitä ovat oikein valitut siivousmenetelmät sekä niihin liittyvät siivousaineet ja -koneet sekä työn lopputulos. Puhdastilaluokat asettavat perusvaatimukset käytettäville siivouskemikaaleille. Puhdastilakohteen vaatavuustasosta saa selkeän käsityksen, kun selvittää, miten puhdasta vettä tilan prosesseissa käytetään. Puhdistus- ja desinfiointiaineiden käytön tavoitteena on lian ja mikrobien poisto, ja niiltä odotetaan mahdollisimman hyvin huuhtoutuvaa, partikkelivapaata ja jopa steriiliä ominaisuutta. A- ja B-luokan tiloissa ohjataan steriilien aineiden käyttöön. (Savon ammatti- ja aikuisopisto 2010b.)

2.6 PMEU (Portable Microbe Enrichment Unit)

PMEU eli kannettava mikrobien rikastusyksikkö on laite näytteiden kuljetusta ja viljelyä varten. PMEU-salkussa näytteet kasvatetaan erityisissä näytteenottoruiskuissa. (Finnoflag Oy 2010.) Näytteet voivat olla joko nestemäisiä, pyyhkäisynäytteitä tai jotakin kiinteää materiaalia (Heitto 2010). Mikrobien optimaalinen kasvu on pyritty varmistamaan

syöttämällä näytteisiin ilmaa tai kaasua ravinteiden sekoittuvuuden parantamiseksi, käyttämällä tarkoituksenmukaisia ravintoalustoja sekä näytteiden kasvatuslämpötilaa valvomalla (Samplion Oy 2010).

Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushankkeella on käytössään PMEU 2G -laitteisto (kuva 1). Termi 2G viittaa laitteen mahdollisuuteen käyttää kasvatukseen tarvittavaa ilmaa ja kaasua yhtä aikaa. Tarvittava kaasu saadaan laitteen ulkopuolisesta kaasupullostasta. Salkkua voidaan käyttää vain näytteen rikastamiseen, analysointi tapahtuu laboratoriossa. Sisälämpötilan säätely tapahtuu salkun kuoriin sijoitetun LCD-näytön ja toimintonäppäinten avulla. Sisäilma lämmitetään ja jäähdytetään peltier-elementin avulla toimivalla lämmityslaitteella. Myös näyteruiskuihin tulevan ilman määrää voidaan säädellä. Ilma poistuu ruiskuista suodattimen kautta. Suodatin poistaa ilmasta kaikki yli 2 µm:n kokoiset partikkelit. (Jokelainen 2010, 15.) Salkussa on paikka kymmenelle näytteenottoruiskulle, ruiskuteline ja lämpöeristyspaneeli, lämmitys-/ jäähdytys-elementit, ilmastuspumppu, akku, LCD -näyttö, merkkivalot, toimintonäppäimet, lukittavat kaapeliliitännät sekä lisävarusteena kaasupullo (Samplion Oy 2010).



KUVA 1. PMEU 2G -laitteisto (Sari Lötjönen 2010)

Salkun käytöllä on monia etuja. Mikrobien osoittaminen tehostuu, kun saadaan luotettavimmat ja nopeammat tulokset. Mikrobista riippuen osoitusaika voi lyhentyä useita tunteja tai jopa päiviä. Lisäksi sekaviljelmien vähemmistölajit ovat myös nopeasti löydettävissä ja ympäristöstressistä kärsivien mikrobien osoitus tehostuu. Salkku minimoi kon-

taminaatoriskin ja parantaa muutenkin mikrobiologisten näytteiden oton ja analytiikan turvallisuutta. Koska salkussa on ihanteelliset rikastusolosuhteet, näytteet säilyvät edustavina. Salkku soveltuu niin aerobeille kuin anaerobeillekin mikrobeille. PMEU-salkun ansiosta näytteiden rikastus alkaa välittömästi näytteenoton jälkeen. Näin ollen kuljetus- ja varastointiaika on hyödynnettävissä näytteiden kasvatukseen. Koulutusta salkun käyttöön on helposti hankittavissa ja sen käyttö ei edellytä laajoja mikrobiologian opintoja. (Samlion Oy 2010.)

Liikuteltavuutensa ansiosta salkkua voidaan käyttää erilaisissa ympäristöissä, kuten ulkona, teollisuuslaitoksissa, valvontatilanteissa ja laboratorioympäristössä. Sovellusalueita, joissa salkkua voidaan käyttää, on monia: puhdistilatuotanto, hygieeninen laadunvalvonta, lääketeollisuus, terveydenhoidon tutkimus ja käytäntö, kosmetiikkateollisuus, ympäristövalvonta, elintarviketeollisuuden mikrobiologia, eläinlääketieteellinen mikrobiologia, maa- ja kalatalous, turvallisuusala sekä puunjalostusteollisuus. Salkussa on myös mahdollista rikastaa antigeenejä ja muita biomolekyylejä. PMEU-salkun suuri etu on sen tuottamat nopeat tulokset, jotka johtavat nopeampaan päätöksentekoon. Se on myös yhteensopiva kaikkien olemassa olevien loppuanalyysien ja osoitusmenetelmien kanssa. (Samlion Oy 2010.) PMEU-menetelmää on hyödynnetty myös muun muassa PCR:n (polymeraasiketjureaktio), immunoanalyysien ja ATP (adenosiinitrifosfaatti) -mittausten esikäsittelymenetelmänä (Hakalehto 2009).

PMEU-salkkua on käytetty erilaisissa tutkimuksissa. Tutkittaessa *Campylobacter*-lajeja juomavedestä todettiin, että PMEU-rikastusmenetelmä on tehokas stressistä kärsivien *Campylobacter*-solujen rikastamisessa. PMEU tuotti suuremman määrän *C. jejuni* -bakteeria kuin tutkimuksen toinen rikastusmenetelmä (STATIC). Tutkimuksessa ilmeni, että salkku vaatii vielä joiltakin osin lisäkehitystä, esim. ruiskupidikkeiden osalta. Kun nämä tekniset vaikeudet saadaan ratkaistua, voidaan salkun liikuteltavuuttakin hyödyntää tehokkaammin. Etenkin vesinäytteiden tutkimisessa on tärkeää saada näytteet mahdollisimman nopeasti kasvatukseen, joten liikuteltavuudesta on tällöin suuri etu. (Pitkänen ym. 2009, 855–857.)

3 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTTAMINEN

3.1 Työn lähtökohdat, tavoitteet ja aiheen rajaus

Opinnäytetyömme aihe saatiin Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushankkeelta, joka on myös työmme hyödynsaaja. Hanke halusi tutkia mahdollisuuksia siirtyä nopeampaan menetelmään veden puhtauden tutkimisessa. Nykyään käytettävä maljakasvatus vie viisi vuorokautta ja tarkoituksena oli tutkia, voisiko PMEU-salkulla saada mahdollinen kasvu näkyviin nopeammin. PMEU-salkkumenetelmän ja maljakasvatuksen paremmuutta ei voida kuitenkaan suoraan vertailla, sillä PMEU-salkkua voidaan käyttää vain mikrobin rikastamiseen. Salkulla ei voida täysin korvata maljakasvatusta, koska bakteerien määrää ruiskunäytteissä ei voida laskea. Tarkoituksena oli siis selvittää, voisiko Puhdastilahanke hyödyntää hankkimaansa PMEU-salkkua vesinäytteiden puhtauden tutkimisessa. Hanke halusi rajata tutkimuksen koskemaan pelkkiä vesinäytteitä, koska tarvetta esimerkiksi pintanäytteiden testaamiseen salkulla ei ole. Nopeuden tutkimiseksi kasvatettiin puhtasvesinäytteitä ja piimästä eristettyä maitohappobakteeria sekä maljoilla että PMEU-salkussa. Puhtaan veden tutkimisella haluttiin vertailla menetelmien rikastusnopeutta ja kasvatusherkkyyttä. Maitohappobakteerin kasvatuksella pyrittiin aikaansaamaan kuvaaja, joka havainnollistaisi eri näytepitoisuuksien kasvunopeutta.

Kävimme keskustelemassa työn ideoinnista hankkeen projektisuunnittelija Leena Tikan kanssa ennen opinnäytetyömme aloittamista. Mukana toteutuksen suunnittelussa oli myös Finnoflag Oy:n laboratorioinsinööri Anneli Heitto. Heiltä saimme ideoita työn toteuttamiseen liittyen esimerkiksi vesinäytteiden ja bakteerin kasvatusten aikataulutukseen ja kasvun tarkastelun aikaväleihin. Tikka oli myös ohjaava opettajamme ja hänen kanssaan suunnittelimme maitohappobakteerista tehtävät laimennokset ja kasvatuksen tarkemmin. Saimme tietoa hankkeen tiloissa käytettävän veden puhdistusmenetelmistä projekti-insinööri Sasu Rissaselta. Tulosten tulkitsemiseen ja johtopäätösten tekemiseen saimme apua Heitolta.

3.2 Resurssit

Työhön tarvittavat elatusliuokset, maljat ja ruiskut tilattiin Finnoflag Oy:ltä. Muut toteutuksessa tarvittavat välineet lainattiin koululta ja toimitettiin välinehuoltajalle steriloitavaksi. Välineiltä vaadittiin niin täydellistä puhtautta, etteivät bakteerit kykene kasvamaan

niissä. Vesinäytteiden kasvatus suoritettiin Puhdastilahankkeen tiloissa. Maitohappobakteerin kasvatuksesta osa tapahtui koulun tiloissa ja osa Puhdastilahankkeen tiloissa.

3.3 Opinnäytetyön toteutus

Työt toteutettiin kahden viikon aikana. Ensimmäisellä viikolla testattiin puhdastilojen puhdasvesihanoista otettuja vesinäytteitä ja toisella viikolla piimästä eristettyä maitohappobakteeria sisältävästä liemiviljelmästä tehtyjä laimennoksia. Näytteitä kasvatettiin sekä maljoilla että salkussa. Ravintoalustana ruiskuissa käytettiin tryptoni-hiivauute-glukoosi- eli THG-ravintoalustaa ja sen konsentroitua muotoa, viisinkertaista THG:a. Maljakasvatuksessa käytettiin sekä THG-agareita, että kromogeenisiä maljoja, CHRO-Magar (Becton-Dickinson).

3.3.1 Puhdasvesinäytteet

Ensimmäinen viikko aloitettiin nimeämällä puhdasvesihanat nimillä D_2 ja B_2 hanojen sijainnin mukaan (kuva 2). Puhdastilojen käsienspesuohjeen mukaan (liite 1) vettä tulisi juokuttaa 30 sekuntia ennen käsien pesun aloittamista, joten juoksetut näytteet otettiin tämän ohjeen mukaan. D_2 -hanasta otettiin näyte ennen veden juoksetusta ja juoksetuksen jälkeen. B_2 -hanasta otettiin myös molemmat näytteet, mutta juoksettamatonta vettä käytettiin vain maljaviljelyyn. Juoksettamattomista vesinäytteistä käytettiin takaliitettä -0.



KUVA 2. Savon ammatti- ja aikuisopiston Bioteknian puhdastilojen pohjapiirros (Puhdas-tila tutkimus- ja koulutuskeskushanke 2010)

Ohjaajamme Leena Tikka otti vesinäytteet puolestamme, sillä meiltä puuttui tarvittava koulutus puhdastiloissa työskentelyyn. Vesinäytteistä laitettiin PMEU-salkkuun kasvamaan 100 µl:n, 1 ml:n ja 10 ml:n näytteet. Kasvatusalustana 10 ml näytteessä käytettiin konsentroituja THG:ia ja kahdessa muussa näytteessä normaalia THG:ia. Näyteruiskujen näytetilavuus tulee olla 10–12 ml. Ennen näytteitä ruiskuihin vedettiin ravintoalustaa siten, että liuoksen lopputilavuus näytteiden laiton jälkeen oli noin 10 ml. Ravintoalusta vedettiin ruiskuun ennen neulan asettamista paikoilleen, jonka jälkeen näyte vedettiin ruiskuun. Pitoisuudet eivät ole tarkkoja, sillä ruiskuihin on mahdotonta vetää tarkalleen tietty määrä näytettä. Viimeiseksi ruiskun lopputilavuus vedettiin täyteen ilmaa, ja neulasuodatinkomponentti käännettiin siten, että neula saatiin ruiskun sisälle. Ilma kulki liuokseen neulan kautta. Ruiskut asetettiin salkun pidikkeisiin ja yhdistettiin suodattimistaan salkussa oleviin letkuihin. Letkun kautta ilma kulki suodattimen läpi aina liuokseen saakka. (Kuva 3.) Ruiskunäytteitä oli 9, joiden lisäksi yhteen ruiskuun laitettiin kontrollinäytteenä kasvamaan pelkkää ravintoalustaa. Maljoille pipetoitiin 100 µl kutakin näytettä ja hajotettiin viljelysauvalla. Maljoja viljeltiin yhteensä 12, koska D₂ -hanan näytteistä viljeltiin myös rinnakkaiset näytteet.



KUVA 3. Salkun sisäpuoli ja ruiskut (Sari Lötjönen 2010.)

3.3.2 Maitohappobakteeria sisältävät näytteet

Toisella viikolla tutkittiin piimästä eristettyä maitohappobakteeria, jonka pitoisuus oli karkeasti arvioituna noin 10^8 solua/ml. Bakteerin toimitti Finnoflag Oy liemiviljelmänä. Bakteeria laimennettiin eri pitoisuuksiksi, jotta salkun kasvatusnopeutta saataisiin testattua. Laimennokset laskettiin Excel- taulukkolaskentaohjelman avulla. Puhdastilan puhtaalle vedelle asettamat raja-arvot, jotka näkyvät taulukossa 6, loivat pohjan pitoisuuksien valinnalle. Päädyttiin pitoisuuksiin 100 solua/ml, 80 solua/ml, 70 solua/ml, 60 solua/ml, 50 solua/ml, 40 solua/ml, 20 solua/ml ja 10 solua/ml.

TAULUKKO 6. Puhdasveden bakteerien raja-arvot (Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushanke 2010).

Lämpötila	Pesäkkeiden määrä
Huoneenlämpö, RT	10 pesäkettä/ml
+ 37 °C	60 pesäkettä/ml

Maitohappobakteerista laimennettiin ensin kantaliuos, josta loput laimennokset tehtiin. Kantaliuoksen teko aloitettiin mittaamalla mittalasiin 99 ml natriumkloridia, joka kaadettiin dekantterilasiin. Sekaan pipetoitiin 1 ml maitohappobakteerin liemiviljelmää. Tätä laimennosta laimennettiin edelleen mittaamalla 99 ml natriumkloridia dekantterilasiin ja pipetoimalla edellisestä laimennoksesta 1 ml sekaan. Tästä laimennoksesta pipetoitiin 20 ml 180 ml:aan natriumkloridia. Näin saatua liuosta kutsuttiin kantaliuokseksi, joka merkittiin numerolla 100. Seuraavat laimennokset tehtiin aina kantaliuoksesta. Näitä laimennoksia tuli yhteensä seitsemän, jotka nimettiin solumäärien mukaan numeroilla 80, 70, 60, 50, 40, 20 ja 10. Niitä valmistettiin koeputkiin niin, että saatiin kutakin laimennosta 50 ml.

Número 80 valmistettiin mittaamalla 40 ml kantaliuosta ja lisäämällä tähän 10 ml natriumkloridia. Número 70 valmistettiin mittaamalla 35 ml kantaliuosta ja lisäämällä 15 ml natriumkloridia. Liuosta número 60 tarvittiin 30 ml kantaliuosta ja 20 ml natriumkloridia. Liuokseen número 50 mitattiin 25 ml kantaliuosta ja 25 ml natriumkloridia. Liuokseen 40 mitattiin 20 ml kantaliuosta ja 30 ml natriumkloridia. Numeroon 20 pipetoitiin 10 ml kantaliuosta ja 40 ml natriumkloridia. Liuokseen 10 pipetoitiin 5 ml kantaliuosta ja 45 ml natriumkloridia. Näytteitä tuli yhteensä kahdeksan kappaletta. Salkun kaikki paikat tulee olla täynnä, jotta salkku toimisi oikein. Salkkuun mahtuu 10 ruiskua, joten siihen laitettiin myös yksi kontrolliruisku, jossa oli pelkästään elatusainetta, ja yksi tyhjä ruisku.

Kantaliuosta ja siitä tehtyjä laimennoksia pipetoitiin 100 µl:aa THG- ja CHROMagar-maljoille. Viljelyyn käytettiin kolmiosauvaa, jolla näyte saatiin levitettyä tasaisesti koko maljalle. Maljoja viljeltiin yhteensä 16. Tämän jälkeen koottiin ruiskut, joissa näytteitä kasvatettiin. Ruiskuun vedettiin ensin 9 ml elatusainetta, jonka jälkeen neula laitettiin paikalleen ja ruiskuun vedettiin 1 ml näytettä. Ruiskun lopputilavuus vedettiin täyteen ilmaa. Seuraavaksi neula käännettiin ruiskun sisälle, jotta ilma pääsi sen kautta kulkemaan liuokseen. Viimeiseksi ruiskuun asetettiin kiinni suodatin, ja ruiskunäytteet laitettiin salkkuun kasvamaan.

3.3.3 Kasvun tarkastelu

Ruiskunäytteitä tarkasteltiin työpäivän puitteissa noin tunnin välein. Kasvu ilmeni ruiskunäytteissä samentumana. Ensimmäisten näytteiden samentuessa tarkistettiin näytteistä tehtyjen maljojen kasvu. Maljoilta tarkasteltiin pesäkkeiden määrää [pmy (pesäkettä muodostavaa yksikköä)/100 µl]. Rinnakkaisilta maljoilta laskettiin pesäkkeiden keskiarvo, jota verrattiin puhdistilan puhtaalle vedelle asetettuihin raja-arvoihin. Maljojen kasvatusta ei enää jatkettu tämän jälkeen. Kolmannen tarkastelupäivän aamuna ruiskunäytteet tarkastettiin viimeisen kerran, jonka jälkeen kasvatusta lopetettiin.

4 TULOKSET

4.1 Puhdastilojen vesinäytteet

Vesinäytteissä alkoi esiintyä kasvua toisena tarkastelupäivänä. Ensimmäisenä kasvua ilmaantui ensimmäisen ja toisen tarkastelupäivän välisenä yönä D₂-näytteisiin. Toisen päivän aikana myös D₂-0 -näytteistä 10 ml:n ja 1 ml:n näytteet alkoivat kasvaa. Kolmannen tarkastelupäivän aamuna kaikki D₂, D₂-0- ja B₂-0 -vesinäytteet olivat sameita. Kontrollinäyte pysyi koko ajan negatiivisena.

Liitteessä 2 on esitetty D₂-näytteiden kasvu. Näytteet alkoivat kasvaa yön aikana, jolloin aamulla näytteitä tarkasteltaessa kaikki ruiskut olivat sameahkoja. Tällöin solumäärän voidaan ajatella olevan noin 10⁷. Selvä sameus, jolloin soluja on ruiskussa karkeasti arvioituna noin 10⁸–10⁹, oli erotettavissa kaikissa ruiskuissa noin puolentoista tunnin kuluttua aamun ensimmäisestä tarkastelusta. Yöllä alkaneen kasvun vuoksi tarkkoja ajankohtia kasvujen alkamisille ei tiedetä, eikä eri näytemäärien eroja kasvunopeuteen saatu selville.

Liitteessä 2 on myös esitetty CHROMagar- ja THG-maljoilta laskettujen pesäkkeiden määrät silloin, kun ruiskunäytteissä havaittiin kasvua ensimmäisen kerran. D₂-maljat luettiin siis heti toisen tarkastelupäivän aamuna. Rinnakkaisilta CHROMagar- ja THG-maljoilta laskettiin pesäkkeiden keskiarvot summaamalla maljojen pesäkeluvut ja jakamalla tulos kahdella eli rinnakkaisten maljojen lukumäärällä. CHROMagarien pesäkkeiden keskiarvoksi saatiin 16 pmy/100 µl ja THG-maljojen 4 pmy/100 µl. Raja-arvojen mukaan CHROMagareilla saatu tulos ylittää puhdastiloissa puhtaalle vedelle asetetut raja-arvot, kun taas THG-maljoilla saatu pysyy raja-arvojen sisällä. Vertailu raja-arvoihin on tosin ainoastaan suuntaa antava, koska puhdastiloissa käytössä olevan ohjeen mukaisista maljakasvatusta käytettäessä inkubaatioajat ovat pidemmät. Jotta voitaisiin arvioida, kuinka monta solua kasvatuksen alkuvaiheessa missäkin pitoisuudessa on, summattiin pesäkkeet sekä CHROMagar-maljoilta että THG-maljoilta yhteen. Saadusta arvosta laskettiin pesäkkeiden keskiarvo jakamalla pesäkkeiden yhteenlaskettu tulos maljojen määrällä eli neljällä, jolloin pesäkkeiden keskiarvoksi saatiin 10 pmy/100 µl. Tästä voidaan päätellä, että maljatulosten perusteella arvioituna lähtötilanteessa 100 µl näytettä sisältävässä ruiskussa on noin 10 bakteerisolua, 1 ml:ssa noin 100 solua ja 10 ml:ssa noin 1000 solua.

D₂-0 -ruiskunäytteiden kasvu nähdään liitteessä 3. Kasvu alkoi toisena tarkastelupäivänä ensin 10 ml:n näytteessä ja muutama tunti myöhemmin myös 1 ml:n näytteessä. Kolmantena tarkastelupäivänä kasvua oli ilmaantunut myös 100 µl:n näytteeseen. Kun liuksen samentuminen 10 ml:n näytteessä havaittiin, tarkastettiin D₂-0 -näytteen kasvu kaikilta neljältä maljalta. Maljoilta lasketut pesäkkeet on ilmoitettu liitteessä 3. Rinnakkaisten CHROMagar-maljojen pesäkkeiden keskiarvoksi saatiin 5 pmy/100 µl, kun taas THG-maljoilla kasvua ei ilmaantunut ollenkaan. Saatu keskiarvotulos on annettujen raja-arvojen sisällä. Kaikkien maljojen pesäkelukujen keskiarvoksi saatiin 2,5 pmy/100 µl, josta voidaan olettaa lähtötilanteessa 100 µl näytettä sisältävässä ruiskussa olevan noin 2,5 bakteerisolua, 1 ml:ssa noin 25 solua ja 10 ml:ssa noin 250 solua. Määrä on aina kymmenkertainen edelliseen verrattuna näytepitoisuuksien mukaan.

Liitteessä 4 on kuvattu B₂-0 -ruiskunäytteiden kasvua. Kolmantena tarkastelupäivänä näytteet kasvoivat kaikilla pitoisuuksilla. Kasvu oli alkanut yöllä, joten tarkkoja aikoja bakteerin kasvamiselle eri pitoisuuksissa ei saatu selville. Sekä rinnakkaiset CHROMagar-maljat että THG-maljat tarkastettiin heti kolmannen tarkastelupäivän aamuna. Mikään maljoista ei kasvanut, mikä käy ilmi liitteestä 4. Maljojen mukaan näytteessä ei siis ollut bakteereita. Ruiskunäytteet alkoivat kuitenkin kasvaa, joten 100 µl:n näytteessä oli vähintään yksi bakteerisolua. Myöskään juoksutetusta vedestä tehdyt maljat eivät kasvanneet.

Puhdastiloissa käytössä olevalla maljakasvatuksella testattujen D₂-, D₂-0-, B₂-0- ja B₂-vesinäytteiden kasvu on taulukossa 7. Kuten taulukosta käy ilmi, D₂-0 -vesinäytteessä ei ollut yhtään kasvua THG- ja CHROMagar-maljoilla testattuna. D₂-näytteessä sen sijaan oli kasvua THG-maljalla. Maljalle ilmestyi pesäkkeitä inkuboitessa sitä huoneenlämmössä. Pesäkkeitä maljalla oli puhdastiloissa puhtaalle vedelle asetettujen raja-arvojen ylittävä määrä. CHROMagarilla ei puolestaan ollut kasvua. B₂-hanasta otetussa näytteessä ei ilmennyt kummallakaan maljalla kasvua.

TAULUKKO 7. Maljakasvatuksen tulokset

	D ₂ -0	D ₂	B ₂	B ₂ -0
THG				
Huoneenlämpö	Ei kasvua	19 pesäkettä	Ei kasvua	Ei kasvua
+ 37 °C	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
CHROMagar				
Huoneenlämpö	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
+ 37 °C	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua

4.2 Maitohappobakteeria sisältävät näytteet

Maitohappobakteeri kasvoi kolmannen tarkastelupäivän aamuna kaikissa laimennoksissa. Tätä ennen kasvua ei ollut havaittavissa. Eri bakteeripitoisuuksia sisältävien näytteiden tarkkoja kasvuajankohtia ei tiedetä, sillä kasvu tapahtui yön aikana. Liitteessä 5 on esitetty maitohappobakteeria eri pitoisuuksia sisältävien ruiskunäytteiden kasvu. Kolmannen tarkastelupäivän aamuna tarkastettiin myös eri bakteeripitoisuuksia sisältävät maljat. Maljoilla ei ollut merkittävää kasvua, mikä näkyy taulukossa 8. Kontrollinäyte oli negatiivinen.

TAULUKKO 8. Kasuvat maitohappobakteerimaljat

	70 solua/ml	80 solua/ml	100 solua/ml
THG	Ei kasvua	2 pesäkettä	1 pesäke
CHROMagar	1 pesäke	Ei kasvua	2 pesäkettä

5 POHDINTA

5.1 Puhdastilojen vesinäytteet

Kasvun ilmaantuminen ruiskunäytteisiin vasta toisena tarkastelupäivänä johtuu lag-vaiheesta eli viivevaiheesta, joka seuraa, kun bakteereita sisältävä näyte lisätään tuoreeseen kasvatuliukokseen (Solunetti 2006.) Bakteerien siirtäminen kylmästä vesijohtovedestä + 37 °C kasvu ympäristöön on ollut niille luultavasti stressitekijä, mikä on saattanut pidentää lag-vaihetta, jolloin kasvua on ollut havaittavissa vasta toisena tarkastelupäivänä. Jotta vähäravinteisesta vesijohtovedestä rikkaaseen kasvatuliukokseen siirretyt bakteerisolut voisivat käyttää liuoksen ravinteita hyödyksi, täytyy niiden valmistaa uusia entsyymejä elatusaineen hyödyntämiseksi. Ensimmäisenä tarkastelupäivänä ruiskunäytteiden tarkastelu tunnin välein oli turhaa, sillä lag-vaiheen jälkeen solujen monistuminen sille tasolle, että bakteerikasvu on silmin nähden havaittavissa, vie lähtöpitoisuudesta riippuen vähintäänkin useita tunteja.

Ensimmäisenä kasvua ilmaantui D₂-ruiskunäytteisiin. D₂-näytteissä oli kaikilta maljoilta laskettujen pesäkkeiden keskiarvon mukaan enemmän bakteerisoluja kasvatuksen lähtötilanteessa kuin D₂-0 -näytteissä. Bakteerien suurempi määrä D₂-näytteessä näkyi myös siinä, että kyseisen hanan näytteet alkoivat kasvaa yön aikana, jolloin toisen tarkastelupäivän aamuna kaikki pitoisuudet kasvoivat, kun taas D₂-0 -näytteistä 10 ml:n ja 1 ml:n näytteet kasvoivat vasta toisen tarkastelupäivän aikana.

D₂-0 -näytteissä oli maljamenetelmällä arvioituna 100 µl näytettä sisältävässä ruiskussa noin 2,5 bakteerisolua kasvatuksen lähtötilanteessa. Näyteruiskussa, jossa näytettä oli 1 ml, oli kymmenen kertaa enemmän näytettä eli noin 25 bakteerisolua, ja 10 ml näytettä sisältävässä ruiskussa edelleen kymmenen kertaa enemmän eli noin 250 solua. Maljoille kasvamaan voidaan laittaa vain 100 µl näytettä, joten kasvamaan laitettu bakteerimäärä oli vähäisempi. Kasvun ilmaannuttua toisena tarkastelupäivänä 10 ml:n ruiskunäytteeseen, tarkastettiin D₂-0 -näytteestä tehdyt maljat. Rinnakkaisten CHROMagar- ja THG-maljojen keskiarvojen mukaan pesäkkeiden lukumäärä pysyi puhdastilan puhtaalle vedelle asetettujen raja-arvojen sisällä. Maljoilla kasvavien pesäkkeiden määrän vertailu raja-arvoihin on ainoastaan suuntaa antava. Havaittaessa kasvua D₂-0 -näytettä 10 ml sisältävässä ruiskussa, rinnakkaisilta maljoilta laskettujen pesäkkeiden keskiarvojen mukaan saadut tulokset olivat kuitenkin vielä raja-arvoissa. Noin neljän tunnin kuluttua kasvun havaitsemisesta 10 ml:n näytteessä, 1 ml:n näytteessä havaittiin samentuminen.

Ruisku oli tällöin sameahko. Noin tunnin kuluttua kasvun havaitsemisesta, näytteiden tarkastelu toisena tarkastelupäivänä lopetettiin. Kolmannen tarkastelupäivän aamuna myös 100 µl näytettä sisältävä ruisku oli samea. Ruiskunäytteistä 10 ml sisältävä näyte alkoi kasvaa nopeammin kuin näytettä 1 ml sisältävä ruisku ja vastaavasti 100 µl sisältävä näyte kasvoi hitaimmin.

Vastaavanlaista vertailua ei voida tehdä D₂-näytteille, koska ruiskunäytteet alkoivat kasvaa yön aikana. Näytteissä oli maljamenetelmällä arvioituna 100 µl näytettä sisältävässä ruiskussa kasvatuksen lähtötilanteessa noin 10 bakteerisolua, 1 ml:ssa näytettä noin 100 solua ja 10 ml:ssa näytettä noin 1000 solua. Näytteiden kasvun alettua yöllä ei vertailumaljoja voitu tarkastaa heti eikä vertailua eri näytemäärien kasvunopeuksista voida tehdä. Maljat tarkastettiin heti toisen tarkastelupäivän aamuna, jolloin rinnakkaisilta CHROMagareilta laskettujen pesäkkeiden keskiarvon mukaan tulos ylitti puhtaalle vedelle asetetut raja-arvot, mutta THG-maljoilta laskettujen pesäkkeiden keskiarvo oli raja-arvojen mukainen.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että tutkittujen kaltaisissa näytteissä, kun laitetaan kasvamaan 1–10 bakteerisolua/100 µl sisältävää näytettä 1 ml, ruiskussa ilmenee kasvua noin 25 tunnin kuluttua kasvatuksen aloittamisesta. Bakteerimäärän ollessa yli 10 bakteerisolua/100 µl ja näytemäärän 1 ml kasvu havaitaan alle 20 tunnin kuluessa. Mitä suurempi bakteerimäärä lähtötilanteessa on, sitä nopeammin kasvu on havaittavissa. Koska PMEU-salkussa oleviin näyteruiskuihin voidaan laittaa näytettä kasvamaan suurempia määriä kuin maljoille, kasvu voidaan todeta nopeammin.

B₂-0 -vesinäytteitä kasvatettaessa ruiskuissa ja maljoilla, tuli PMEU-salkun tehokkuus ympäristöstressistä kärsivien mikrobien osoituksessa esiin. Ruiskunäytteet kasvoivat kaikilla pitoisuuksilla kolmannen tarkastelupäivän aamuna, mutta mikään neljästä maljasta ei kasvanut. Maljojen mukaan vesinäyte ei siis sisältänyt bakteereja, mutta ruiskunäytteiden mukaan 100 µl:ssa oli ainakin yksi bakteerisolua. PMEU:ssa kasvuun lähtevät siis sellaisetkin bakteerisolut, joita ei maljamenetelmällä saada esiin.

Puhdastilojen käsienspesuohjeen mukaan vettä on laskettava 30 sekuntia ennen veden käyttämistä. Saatujen tulosten mukaan kuitenkin juoksutettu vesi (D₂) sisälsi enemmän bakteereja kuin juoksuttamaton vesi (D₂-0). Jotta voitaisiin pois sulkea kontaminaation eli näytteiden saastumisen mahdollisuus näytteenotossa tai näytteiden kasvatukseen laittamisen yhteydessä, varmistettiin saadut tulokset ottamalla uudet vesinäytteet vastaavalla tavalla ja kasvattamalla niitä puhdastiloissa käytössä olevalla maljakasvatuksella. Näin varmistettiin myös, etteivät näytteet mahdollisesti olleet sekoittuneet keskenään.

Saadut tulokset vastasivat PMEU-salkulla saatuja tuloksia. D₂-tilan hanasta juoksuttamatta otetussa vesinäytteessä ei kasvanut bakteereja, kun taas samasta hanasta käsienpesuohjeen mukaisesti otetussa vesinäytteessä oli kasvua.

Vesi on jatkuvassa vuorovaikutuksessa verkostomateriaalin kanssa viipyessään putkistoissa. Vuorovaikutus koostuu monista ilmiöistä, joita ovat mm. aineiden liukeneminen materiaaleista, mikrobitoiminta biofilmeissä eli ympäristön uhkia vastaan tehokkaasti suojautuneissa eri mikrobien muodostamissa yhdyskunnissa, ja vedessä, aineiden tarttuminen pinnoille sekä saostumien kertyminen. Paineiskujen seurauksena biofilmiä ja muita verkostojen saostumia voi irrota putkistoista. (Ahonen & Keinänen-Toivola 2009, 26–27.) Bakteerien suurempi määrä D₂-näytteissä voi johtua siitä, että juoksutettaessa vettä hanasta käsienpesuohjeen mukaisesti, putkistosta on voinut irrota biofilmiä tai saostumia näytteeseen. B₂-tilan vesihanasta juoksutetusta ja juoksuttamattomasta vedestä ei löytynyt vastaavia eroja.

5.2 Maitohappobakteeria sisältävät näytteet

Piimästä eristettyä maitohappobakteeria arvioitiin olevan Finnoflag Oy:n toimittamassa liemiviljelmässä noin 10⁸ solua. Arvio perustuu silmämääräiseen arvioon liemen sameudesta, joten varmoja bakteerin todellisesta määrästä ei voida olla. Tästä oletuksesta bakteeria lähdettiin kuitenkin laimentamaan. Liemiviljelmää laimennettiin n. 10⁸ solusta 100 solua/ml sisältäväksi kantaliuokseksi, jota laitettiin yhteen ruiskuista kasvamaan. Kantaliuoksesta tehtiin loput laimennokset, jotka pienenevät kymmenen solun välein.

Maitohappobakteeria eri pitoisuuksia sisältävät näytteet kasvoivat kolmannen tarkastelupäivän aamuna kaikissa ruiskuissa. Tätä ennen kasvua ei ollut havaittavissa. Bakteeria laimentamalla eri pitoisuuksiksi oli tarkoitus testata salkun kasvatusnopeutta. Tarkoituksena oli siis saada muodostettua kuvaaja, josta näkisi, kuinka kauan eri pitoisuuksia bakteeria sisältäviltä näytteiltä kestää alkaa kasvaa. Suurimman määrän bakteeria sisältävän näytteen olisi olettanut kasvavan ensimmäisenä, toiseksi eniten bakteeria sisältävän seuraavana jne. Tuloksia ei kuitenkaan saatu, sillä kasvu tapahtui yön aikana, jolloin tarkastelua ei tehty. Eroja eri pitoisuuksien välille ei saatu myöskään siksi, että laimennosten erot olivat kasvatuksessa liian pieniä, eli käytännössä siis ruiskuihin laitettujen liuokset olivat pitoisuuksiltaan hyvin lähellä toisiaan. Laimennosten liian pienet erot tulivat esiin myös tarkasteltaessa eri laimennoksista tehtyjä maljoja. Pesäkkeitä oli THG-maljalla pitoisuudella 100 solua/ml vain yksi, kun taas pitoisuudella 80 solua/ml kaksi.

D₂-näytteessä arvioitiin maljojen pesäkkeiden keskiarvon mukaan olevan 1 ml:ssä näytettä noin 100 bakteerisolua kasvatuksen lähtötilanteessa. Puhdastilan vesinäytteistä tehtyjen kasvatusten perusteella olisi siis voinut olettaa 100 solua/ml sisältävän näytteen kasvavan jo toisen tarkastelupäivän vastaisena yönä. Näyttää siltä, että maitohappobakteerinäytteen lähtöpitoisuus oli selvästi arvioitua pienempi, koska näyte kasvoi vasta kolmannen tarkastelupäivän vastaisena yönä. Erilaisten bakteerien kasvunopeudet ovat tosin myös hyvin erilaisia, eikä niitä siinä mielessä voi suoraan verrata keskenään. Liemiviljelmässä bakteerit eivät myöskään huolellisesta sekoittamisesta huolimatta ole jakautuneet aivan tasaisesti, joten hyvin pienillä bakteeripitoisuuksilla solujen päätyminen näyteruiskuihin tai maljoille on sattumanvaraista. Se, että alkuperäistä liemiviljelmää laimennettiin liikaa, voi siis olla syynä sille, ettei kasvua tapahtunut aikaisemmin. Jokaisessa pitoisuudessa oli kuitenkin ainakin yksi bakteerisolua, sillä kaikki ruiskut samentuivat lopulta.

5.3 Johtopäätökset ja kehittämishaasteet

Vesinäytteiden osalta asetetut tavoitteet saavutettiin, mutta maitohappobakteerin kasvatuksella haettu hyöty jäi saamatta. Tulokset saadaan PMEU-salkulla nopeammin, koska näyteruiskuihin voidaan laittaa näytettä kasvamaan suurempia määriä kuin maljoille. Mitä enemmän näytteessä on bakteereja, sitä nopeammin kasvu on havaittavissa. Saatujen tulosten pohjalta tehtyjen johtopäätösten perusteella 1 ml näytettä, joka sisältää lähtötilanteessa 1–10 solua/100 µl, kasvaa noin 25 tunnin kuluessa. Yli 10 solua/100 µl sisältävä näyte kasvaa puolestaan alle 20 tunnin kuluessa. PMEU-salkussa saadaan kasvamaan myös sellaiset bakteerisolut, joita ei maljamenetelmällä saada esiin.

PMEU-salkun hyödyntämistä muissa puhdastilan mikrobiologisissa näytteenotoissa, esimerkiksi pintanäytteiden tutkimisessa voitaisiin testata. Juoksuttamattoman ja juoksettun puhtaan veden eroja voitaisiin vielä tutkia. Näin voitaisiin saada selville, lähteekö putkistosta liikkeelle jotain epäpuhtauksia veden juoksutuksen yhteydessä.

5.4 Luotettavuus ja eettisyys

Tutkimuksen luotettavuuteen vaikuttavat tutkija ja tutkijan taidot, aineiston laatu, aineiston analyysi ja tutkimustulosten esittäminen. Tutkimusetiikka edellyttää, että tutkija huomioi toiminnassaan tutkimuksen kohteena olevat henkilöt, heidän omaisensa, rahoittajat, työyhteisönsä ja työtoverinsa. Eettinen vastuullisuus pitää sisällään tutkimusaineiston hankinnan ja tutkimuksen kaikkien vaiheiden tarkka ja rehellinen toteuttaminen. (Syrjälä 2005.)

Käyttämällä kontrollinäytteitä sekä puhdastilan vesihanoista otettujen näytteiden että maitohappobakteerin kasvatuksessa varmistettiin, ettei elatusliuos sisältänyt mikrobeja. Jos pelkkää elatusliuosta sisältävä ruisku olisi kasvanut, ei saatuihin tuloksiin voitaisi luottaa, koska ei tiedettäisi, kasvaako ruiskussa vedestä vai elatusliuoksesta lähtöisin oleva bakteeri. Mahdollinen kontaminaatio vesinäytteenotossa tai -näytteiden kasvatukseen laittamisen yhteydessä pois suljettiin ottamalla uudet vesinäytteet vastaavalla tavalla ja kasvattamalla niitä puhdastiloissa käytössä olevalla maljakasvatuksella. Näin varmistettiin myös, etteivät näytteet mahdollisesti olleet sekoittuneet keskenään.

Opinnäytetyön toiminnallisesta osuudesta saatuja tuloksia tulkitsemassa oli myös Finnflag Oy:n laboratorioinsinööri Anneli Heitto. Asiantuntijan mukana olo tuo työllemme luotettavuutta. Luotettavuutta tuo myös se, että saimme asiantuntija-apua itsellemme vaikeissa aihealueissa, kuten veden puhdistukseen liittyvissä asioissa. Lähdemateriaalina olemme pyrkineet käyttämään luotettavia tietolähteitä. Vaikka tietoa ei ollut saatavilla paljon, olemme kuitenkin valinneet lähteemme tarkasti. Lähdeviitteet on merkattu ohjeiden mukaisesti oikeille paikoilleen, jotta lainattu teksti ja oma pohdinta voidaan erottaa tekstistä selvästi. Lähteet ja lähdeviitteet merkitsemällä toimimme eettisesti oikein.

Koska suoritimme toiminnallisen osuuden vain kerran, meillä ei ole toisiinsa vertailtavia tuloksia. Toistojen määrä lisäisi luotettavuutta. Nyt olemme tehneet johtopäätöksiä yksien tulosten perusteella. Mikäli testattava bakteeri laimennettaisiin suuremmilla pitoisuuseroilla ja mikäli bakteerin kasvuominaisuudet vastaisivat paremmin vesibakteerien ominaisuuksia, voitaisiin salkun rikastusominaisuuksista piirtää kuvaaja. Kuvaaja havainnollistaisi, millä pitoisuuksilla ja miten nopeasti bakteeri rikastuisi PMEU-salkussa.

LÄHTEET

Ahonen, M. & Keinänen-Toivola, M. 2009. Vaikuttaako verkostomateriaali talousveden laatuun - vai päinvastoin?. *Ympäristö ja terveys*. Elintarvike – ja ympäristöhygienian sekä työsuojelun erikoislehti 3, 26–29.

CleanRoomTech. 2008a. *Puhdastilat* [viitattu 17.9.2010]. Saatavissa: <http://www.crtoy.com/puhdastilat/?c=0>

CleanRoomTech. 2008b. *Puhdastilaluokitukset*. Puhdastilaluokat. Puhdastilat [viitattu 19.9.2010]. Saatavissa: http://www.crtoy.com/puhdastilat/crt_ptluokitukset.pdf

EngineeringToolBox. 2010. *Clean Rooms – ISO Standard 14644-1* [viitattu 8.10.2010]. Saatavissa: http://www.engineeringtoolbox.com/clean-rooms-iso-d_933.html

Finnoflag Oy. 2010. *General Presentation* [tulostettu 13.4.2010]. Moniste.

Hakalehto, E. 2009. *PMEU -teknologian perusteet* [verkkajulkaisu]. Samplion Oy [viitattu 15.4.2010]. Saatavissa: <http://rapidmicrobiologywithpmeu.blogspot.com/search?updatedmin=2009-01-01T00%3A00%3A00-08%3A00&updated-max=2010-01-01T00%3A00%3A00-08%3A00&max-results=15>

Heikkilä, P. 2009. *Kemikaaliturvallisuus puhdastilassa*. TKK/MICRONOVA. Luentomateriaali.

Heikkilä, R. 2002. Bakteriologia. Teoksessa Hellstén, S. (toim.) *Klininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Helsinki: Suomen Kuntaliitto, 31–51.

Heikkilä, R. & Meurman, O. 2002. Laboriodiagnostiikka. Teoksessa Hellstén, S. (toim.) *Klininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Helsinki: Suomen Kuntaliitto, 93–97.

Heitto, Anneli 2010. Laboriorioinsinööri. Finnoflag Oy. 20.4.2010. Suullinen tiedoksianto.

Jokelainen, J. 2010. *Mikrobinrikastuslaitteiston kehitystyö*. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö [viitattu 24.10.2010]. Saatavissa: https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/14032/Juha_Jokelainen.pdf?sequence=1

Kuopion vesi. 2009. *Hyvä vesi – puhdas ympäristö* [verkkojulkaisu]. Kuopion vesi liikelaitos [viitattu 25.8.2010]. [http://www.kuopio.fi/attachments.nsf/Files/010210123009910/\\$FILE/Kuopion_Vesi_toimintaesite_2009.pdf](http://www.kuopio.fi/attachments.nsf/Files/010210123009910/$FILE/Kuopion_Vesi_toimintaesite_2009.pdf)

Malmioja, S. 2010. *Mikä ihmeen GMP?*. Savon ammatti- ja aikuisopisto. Puhdastilapassi-kurssimateriaali.

Miettinen, T. 2006. *Puhdastilojen suunnitteluprosessi ja teknisten järjestelmien validointi*. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Diplomityö [viitattu 19.9.2010]. Saatavissa: <https://www.doria.fi/handle/10024/30200>

Millipore. 2010a. Overview of Contaminants. Water in the Laboratory - A Tutorial. Lab Water [viitattu 24.5.2010]. Saatavissa: <http://www.millipore.com/>

Millipore. 2010b. Overview of Lab Water Grades. Water in the Laboratory - A Tutorial. Lab Water [viitattu 24.5.2010]. Saatavissa: <http://www.millipore.com/>

Millipore. 2010c. Reverse Osmosis. Overview of Purification Techniques. Water in the Laboratory - A Tutorial. Lab Water [viitattu 24.5.2010]. Saatavissa: <http://www.millipore.com/>

Millipore. 2010d. Field Testing Water and Wastewater. Process Monitoring [viitattu 19.10.2010]. Saatavissa: <http://www.millipore.com/>

Pitkänen, T., Bräcker, J., Miettinen, I.T., Heitto, A., Pesola, J. & Hakalehto, E. 2009. Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009 nro 7, 849–858.

Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushanke 2010. Puhdastilojen periaatteellinen pohjapiirros. Kuva. Saatu sähköpostissa: Sari.Lotjonen(at)student.savonia.fi.

Rajala, K. 2007. Puhdastilatyöskentely. *Analyysi*. Suomen laboratorioalan Liitto ry:n ammatti- ja yhdistyslehti [verkkolehti]. 2007 nro 3 [viitattu 17.9.2010]. Saatavissa: http://www.laborantti.net/analyysit/analyysi_3_07_net.pdf

Rissanen, S. 2010a. *Puhdastilat*. Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushanke. Puhdastilapassi-kurssimateriaali.

Rissanen, S. 2010b. Opinnäytetyöstämme [sähköposti]. Vastaanottaja Jenni Tuovinen. Lähetetty 27.4.2010 [viitattu 2.5.2010].

Samplion Oy. 2010. *Kannettava mikrobien rikastusyksikkö (PMEU)* [verkkajulkaisu]. Samplion Oy [viitattu 15.4.2010]. Saatavissa: http://www.samplion.fi/Samplion_finnish.pdf

Savon ammatti- ja aikuisopisto. 2010a. Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushanke 2009–2010. Puhdastila. Hanketoiminta [viitattu 8.10.2010]. Saatavissa: <http://www.sakky.fi/index.asp?id=244&menupath=244&language=1&klik=1>

Savon ammatti- ja aikuisopisto. 2010b. *Puhdastilasivous*. Puhdastila tutkimus- ja koulutuskeskushanke. Puhdastilapassi-kurssimateriaali.

SFS-EN 19458 2007. *Veden laatu. Näytteenotto mikrobiologista tutkimusta varten*. Teoksessa *Mikrobiologiset vesitutkimusmenetelmät*. Osa 1: Yleiset menetelmät. SFS-käsikirja 94-1. 2010. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.

Solunetti. 2006. Mikropopulaation kasvuvaiheet. Kasvu ja lisääntyminen. Mikrobit [viitattu 26.11.2010]. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/etusivu/>

Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 461/2000. Finlex. Lainsäädäntö [viitattu 18.4.2010]. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2000/20000461>

Syrjälä, O. 2005. *Vuorovaikutuskulttuuri hoitotyössä*. Turun ammattikorkeakoulu. Kypsyysnäyte [viitattu 18.12.2010]. Saatavissa: http://hoitonetti.turkuamk.fi/Hoitonetti/2005_Vuorovaikutuskulttuuri/Tutkimuksenluotettavuus.html

VWR. 2010. Puhdastilaluokitukset. Puhdastilat. Tuotteet [viitattu 8.10.2010]. Saatavissa: <http://fi.vwr.com/app/Home>

Ylönen, H. 2002. Mikrobiologisten näytteiden ottaminen. Teoksessa Hellstén, S. (toim.) *Klininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Helsinki: Suomen Kuntaliitto, 98–114.

SAVON AMMATTI- JA AIKUISOPISTO Puhdastilat Bioteknia	Toimintaohje T1	Versio 2	Voimassaoloaika 6.4.2010-6.4.2012	1(1)
Käsienpesu				

Toimintaohjeen tarkoitus on ohjeistaa työntekijä oikeaan käsienpesutekniikkaan.

1. Juoksuta vettä hanasta noin 30 sekuntia. Kastele kädet ja käsivarret kyynärpäihin asti.
2. Ota annostelijasta pesuainetta kaksi annosta toiseen käteen.
3. Hiero pesuaineella kädet, erityisesti sormenpäät, kynsien alustat, sormienvälit, kämmensyrjät ja peukalot.
4. Pese kädet ja käsivarret huolellisesti edeten sormenpäistä kyynärpäihin.
5. Huuhtelee kädet ja käsivarret juoksevan veden alla niin, että veden valumissuunta on sormista kyynärpäihin.
6. Kuivaa kädet kertakäyttöpyyhkeellä taputellen sormista kyynärpäihin, ota tarvittaessa lisää paperia. Desinfektioaineen alkoholi laimenee kostealla iholla.
7. Ota annostelijasta käsihuhdetta yksi annos vasempaan käteen ja desinfioi oikean käden sormenpäät vasemmassa kädessä olevalla aineella.
8. Desinfioi oikea käsi huolellisesti läpikäyden kaikki sormien välit, kämmensyrjät, peukalo ja kämmenen uurteet alkaen sormenpäistä edeten hitaasti samansuuntaisesti kyynärpäähän saakka.
9. Ota annostelijasta käsihuhdetta yksi annos oikeaan käteen ja desinfioi vasemman käden sormenpäät oikeassa kädessä olevalla aineella.
10. Desinfioi vasen käsi huolellisesti läpikäyden kaikki sormien välit, kämmensyrjät, peukalo ja kämmenen uurteet alkaen sormenpäistä edeten hitaasti samansuuntaisesti kyynärpäähän saakka.
11. Anna käsien kuivua ja desinfioitua rauhassa.

Päivittänyt: _____ / _____ / 20____

Riitta Valjakka-Koskela,
farmasianalan asiantuntija

Hyväksyjä: _____ / _____ / 20____

Sirkka Malmioja, projektipäällikkö

D₂, juoksutettu vesi

1. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
12:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
13:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
14:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
15:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua

2. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
8:10	Sameahko	Sameahko	Sameahko
09:45	Samea	Samea	Samea
11:50	Samea	Samea	Samea
13:30	Samea	Samea	Samea
14:30	Samea	Samea	Samea

3. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
10:30	Samea	Samea	Samea

Maljat

THG	4 pesäkettä
-rinnakkaismalja	4 pesäkettä
CROMagar	24 pesäkettä
-rinnakkaismalja	8 pesäkettä

D₂ – 0, juoksuvesi

1. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
12:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
13:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
14:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
15:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua

2. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
8:10	Ei kasvua	Ei kasvua	Sameahko
09:45	Ei kasvua	Ei kasvua	Samea
11:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Samea
13:30	Ei kasvua	Sameahko	Samea
14:30	Ei kasvua	Sameahko	Samea

3. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
10:30	Samea	Samea	Samea

Maljat

THG	Ei kasvua
-rinnakkaismalja	Ei kasvua
CROMagar	7 pesäkettä
-rinnakkaismalja	3 pesäkettä

B2 - 0, juoksuttamaton vesi

1. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
12:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
13:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
14:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
15:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua

2. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
8:10	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
09:45	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
11:50	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
13:30	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua
14:30	Ei kasvua	Ei kasvua	Ei kasvua

3. tarkastelupäivä

klo.	100 µl	1ml	10ml
10:30	Samea	Samea	Samea

Maljat

THG	Ei kasvua
-rinnakkaismalja	Ei kasvua
CROMagar	Ei kasvua
-rinnakkaismalja	Ei kasvua

www.savonia.fi

